

Primer Design For Identification Of Beta-Carotene Encoding Genes In Cassava

Mutia Anika¹, Dwi Hilda Putri¹, Wahyuni²

¹ Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang

²Puslit Bioteknologi Lembaga ilmu pengetahuan Indonesia (LIPI)

mt.anika20@gmail.com

Abstract. Primers are oligonucleotides which have an important role in the PCR process. To get the primer can be done by doing a primary design. Beta-carotene encoding genes are genes that play a role in the formation of beta-carotene in carotenoid biosynthetic pathways in several plants including cassava. This study aims to obtain primers who can identify beta-carotene encoding genes in cassava plants. Primers are designed using primary 3 plus software online. The results obtained were five specific primers, namely PSY, CRTISO, LCY α , LCY β , and BCH primers which could identify beta-carotene coding genes such as PSY, CRTISO, LCY α , LCY β , and BCH on cassava. Primers designed according to the criteria for primary length, GC content and temperature melting for beta-carotene encoding genes in cassava.

Katakunci : Desain Primer, Beta-karoten, Gen



This is an open access article distributed under the Creative Commons 4.0 Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. ©2017 by author and Universitas Negeri Padang.

1. PENDAHULUAN

Polimerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu reaksi *in vitro* untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target tersebut melalui bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam suatu thermocycler (Muladno, 2010). Kelebihan dari metode PCR adalah bahwa reaksi ini dapat dilakukan dengan menggunakan komponen dengan jumlah sangat sedikit. Metode ini juga memiliki tingkat spesifisitas yang tinggi dalam mengamplifikasi suatu fragmen. Spesifisitas fragmen yang akan diamplifikasi ditentukan oleh banyak faktor, salah satu faktor utamanya adalah pemilihan primer yang tepat (Yuwono, 2006).

Primer adalah suatu sekuens oligonukleotida pendek (15-25 basa, nukleotida) yang berfungsi untuk mengawali sintesis rantai DNA dalam reaksi berantai polimerase. Keberhasilan suatu proses PCR sangat ditentukan oleh komposisi primer (Yuwono, 2006). Untuk mendapatkan primer dapat dilakukan dengan cara melakukan desain primer. Desain primer dapat diperoleh dengan menggunakan bantuan *software* bioinformatik. *Software* akan secara otomatis menentukan primer yang layak pada suatu sekuens. Namun tidak semua hasil pemilihan primer secara otomatis sesuai dengan harapan, sehingga diperlukan campur tangan secara manual (Judelson, 2006).

Dalam mendesain suatu primer perlu diperhatikan beberapa hal, diantaranya adalah spesifisitas, panjang primer 18-30 bp, kadungan GC masing-masing primer harus berada dalam kisaran 40-60%. suhu leleh (T_m) optimal berkisar 52-58°C, peniadaan basa Timin (T) pada 3'-end. Selanjutnya perlu diketahui apakah primer tidak tumpang tindih dengan primer lainnya dalam campuran reaksi, karena ini akan mendorong pembentukan primer dimer. Untuk memudahkan proses optimasi perlu digunakan perangkat lunak khusus (Abd-Elsalam, 2003; Borah, 2011; McPherson *et al.*, 2001; Dieffenbach *et al.*, 1993). Desain primer yang spesifik dapat digunakan dalam identifikasi suatu gen.

Gen penyandi beta-karoten merupakan gen-gen yang berperan dalam pembentukan beta-karoten dalam jalur biosintesis karotenoid pada beberapa tanaman termasuk ubi kayu. Menurut Hartati (2012) terdapat beberapa aksesori ubi kayu yang telah diketahui mengandung beta-karoten yang tinggi. Beta-karoten merupakan salah satu dari kelompok karotenoid yang mempunyai peranan sangat penting, yaitu memberikan kontribusi terhadap warna bahan pangan dan juga nilai gizi sebagai provitamin A (Goldman *et al.*, 1983 dalam Histifarina, 2004). Terdapat beberapa gen yang terlibat dalam jalur biosintesis karotenoid penyandi beta-karoten seperti *phytoene synthase* (PSY), *karotenoid isomerase* (CRTISO), α -*lycopene cyclase* (Lcy α), β -*lycopene cyclase* (Lcy β) dan β -*cincin hidroksilase* (BCH) (Carvalho, 2016).

Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan primer gen penyandi beta-karoten yang spesifik pada tanaman ubi kayu.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu: Seperangkat komputer dengan *software design primer* yaitu *Primer 3 plus (online)*, koneksi internet ke situs *Phytozome 12 Manihot esculenta database (online)*, autoklaf, erlenmeyer, *beaker glass*, batang pengaduk, kompor listrik, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung eppendorf, mikropipet, tip, *vortex*,

sentrifuge, LAF (*laminar air flow*), mesin PCR, *microwave*, mesin elektroforesis dan *UV illuminator*.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu : DNA *template*, alat tulis, alkohol 70%, 10x *reaction buffer*, dNTPs, *taq polymerase*, *UltraPure Destiled water* (ddH₂O), *primer forward* dan *primer reverse* hasil desain, DNA *template*, agarosa, TAE 1X, EtBr, DNA *ladder* 50 kb, *loading dye*, dan kertas parafilm.

2.2 Metode

2.2.1 Gen Penyandi Beta-Karoten

Nomor aksesori beberapa gen penyandi beta-karoten (PSY, CRTISO, Lcy α , Lcy β dan BCH 1) diperoleh berdasarkan jurnal penelitian Carvalho (2016). Sekuen gen penyandi beta-karoten yang diperoleh dari situs *Phytozome 12 Manihot esculenta database (online)* digunakan sebagai *template* dalam mendesain sepasang primer.

2.2.2 Desain Primer

Target gen yang akan didesain adalah gen PSY, CRTISO, LCY α , LCY β , dan BCH 1. Sekuens gen diambil pada situs *Phytozome 12 Manihot esculenta database (online)* dimasukkan pada program primer didesain, primer 3 plus. Kriteria primer didasari oleh kriteria desain primer Udvardi *et al.* (2008). Spesifikasi primer dinilai dengan melakukan *Blast* terhadap primer yang telah di desain pada *Manihot esculenta database* *Phytozome 12*.

2.2.3 Amplifikasi Fragmen Gen Penyandi Beta-Karoten dengan Teknik PCR

Template DNA yang digunakan untuk amplifikasi berasal dari cDNA yang diisolasi dari umbi ubi kayu. Siklus suhu PCR, yaitu pra denaturasi 94 °C selama 2 menit, dilanjutkan 35 siklus meliputi denaturasi 94 °C selama 30 detik, *annealing* 60 °C selama 1 menit, *extention* 72 °C selama 1 menit, dan terakhir *post extention* 72 °C selama 5 menit.

2.2.4 Visualisasi Produk PCR

Produk PCR divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1%

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Tahapan pertama dalam penelitian adalah mendesain primer gen-gen yang akan dianalisis. Desain primer dilakukan dengan program Primer 3 Plus. Tahap awal desain primer pada program primer 3 plus didapat 5 alternatif pasang primer untuk setiap gen. Lima primer alternatif akan dianalisis untuk menentukan primer yang akan digunakan.

Setelah analisis primer alternatif dilakukan untuk setiap gen target ditetapkan 5 pasang primer. Hasil desain primer kelima gen dapat dilihat pada Tabel 1.

Program Primer 3 Plus yang digunakan untuk desain primer pada penelitian ini memiliki keunggulan yaitu lebih efektif dan mudah dibandingkan secara manual. Hasil yang didapatkan jauh lebih baik, dimana faktor-faktor yang mempengaruhi suatu reaksi PCR lebih mudah untuk diketahui dan bisa dibuat sesuai kebutuhan. Salah satu faktor yang sangat penting dalam reaksi PCR adalah pemilihan primer DNA yang tepat. Menurut Syamsurizal (2013) primer bertanggungjawab untuk mengenali dan menandai segmen DNA *template* yang akan diamplifikasi. Jika primer tidak tepat, maka reaksi PCR tidak akan berjalan dengan baik. Pada proses PCR, primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA (Yusuf, 2010)

Pemilihan primer yang digunakan dalam penelitian ini didasari beberapa aspek yang harus diperhatikan, diantaranya kandungan GC konten, panjang primer, suhu *melting*, posisi primer dan lainnya. Hal tersebut diungkapkan oleh Diffenbach and Dveksler (1995) bahwa beberapa hal yang harus diperhatikan dalam mengkonstruksi primer adalah: Panjang primer, nukleotida terakhir pada primer, perbandingan GC dan Tm (*Melting Temperature*) dan adanya dimer.

Panjang primer yang dipilih adalah 20 bp (Tabel 1). Menurut Udvardi *et al.* (2008) untuk mendesain primer gen yang spesifik membutuhkan panjang primer berkisar 18 sampai 25 bp. Panjang primer ini berperan dalam menentukan waktu *annealing* reaksi PCR. Primer yang terlalu pendek (dibawah 15 pasang basa) akan mengurangi kespesifikan primer, sebaliknya primer yang terlalu panjang juga menyebabkan reaksi PCR tidak berjalan efektif (Diffenbach dan Dveksler, 1995).

Tm primer hasil desain yaitu berkisar 54°C-56.6°C. Tm (*melting temperature*) merupakan temperatur saat setengah untai DNA ganda terpisah. Nilai Tm akan berpengaruh pada suhu denaturasi untai *double helix* DNA dan suhu *annealing* (penempelan) primer. Primer dengan Tm terlalu tinggi melebihi 70°C akan mudah mengalami *mispriming* pada temperatur rendah. Selain itu, terbentuknya ikatan yang terlalu kuat antara *template* DNA dan primer akan mengakibatkan produk PCR yang dihasilkan rendah (Borah, 2011). Sedangkan primer dengan Tm rendah tidak akan dapat bekerja pada temperatur tinggi. Tm primer hasil desain telah memenuhi acuan pada program. Pada kedua primer tersebut terdapat perbedaan nilai Tm sebesar 1°C. Perbedaan nilai Tm antar dua primer yang diperbolehkan adalah tidak lebih dari 5°C. Hal ini akan menjamin

diperolehnya temperatur *annealing* yang tepat dan spesifik pada proses PCR (Bartlett *et al.*, 2003).

Temperatur *annealing* (T_a) merupakan suhu yang diperkirakan agar primer dapat berkaitan dengan template (DNA) secara stabil. Suhu aneling yang tinggi akan menyulitkan terjadinya ikatan primer sehingga menghasilkan produk PCR yang kurang efisien. Sebaliknya, suhu aneling yang terlalu rendah menyebabkan terjadinya penempelan primer pada DNA di tempat yang tidak spesifik. Nilai suhu aneling yang sebanding dengan suhu leleh menyebabkan suhu aneling tidak dimasukkan dalam perhitungan keoptimalan desain primer (Sasmito *et al.*, 2014).

Posisi primer yang dipilih dekat dengan ujung 3' karena daerah yang dekat ujung 3' umumnya lebih unik daripada *coding sequence* dan lebih dekat dengan situs awal RT (Udvardi *et al.*, 2008). Kandungan GC primer yang dipilih berkisar 50% atau 55% (Tabel 1). Hal ini disebabkan oleh kandungan GC akan mempengaruhi suhu *annealing* PCR. Untuk memtuskan tiga ikatan hidrogen Guanin dan sitosin membutuhkan energi yang besar dan suhu yang tinggi (Campbell *et al.*, 2008).

Tabel 1. Hasil Desain Primer

Nama Primer	Primer	Urutan Basa 5'-3'	Tempratur Melting (°C)	G+C content (%)	Panjang primer
PSY	<i>Forward</i>	CAC AGG ATG AAT TGG CAC AG	54.1	50	20
	<i>Reverse</i>	TTG CAG CAC TCA GCT CTG TC	57.7	55	
CRTISO	<i>Forward</i>	CGA TAG CTG CTT TCC TGG AC	55.6	55	20
	<i>Reverse</i>	CTT AAC CAG CCG AGA AGT CG	55.4	55	
LCY A	<i>Forward</i>	GCC ACA AGA AAG GAA ACG TC	54.4	50	20
	<i>Reverse</i>	CAT AGT TGC TCC GGT TGG AT	54.8	50	
LCY B	<i>Forward</i>	CAG AAG CTA GGC GAT CCA GT	56.6	55	20
	<i>Reverse</i>	AGT CCA GAA GCA CGG GAA TA	55.8	50	
BCH 1	<i>Forward</i>	GCC TAT TTC CCC TAC CTC CA	56	55	20
	<i>Reverse</i>	TGA AGC TCC CTA TCC AAT GC	54.7	50	

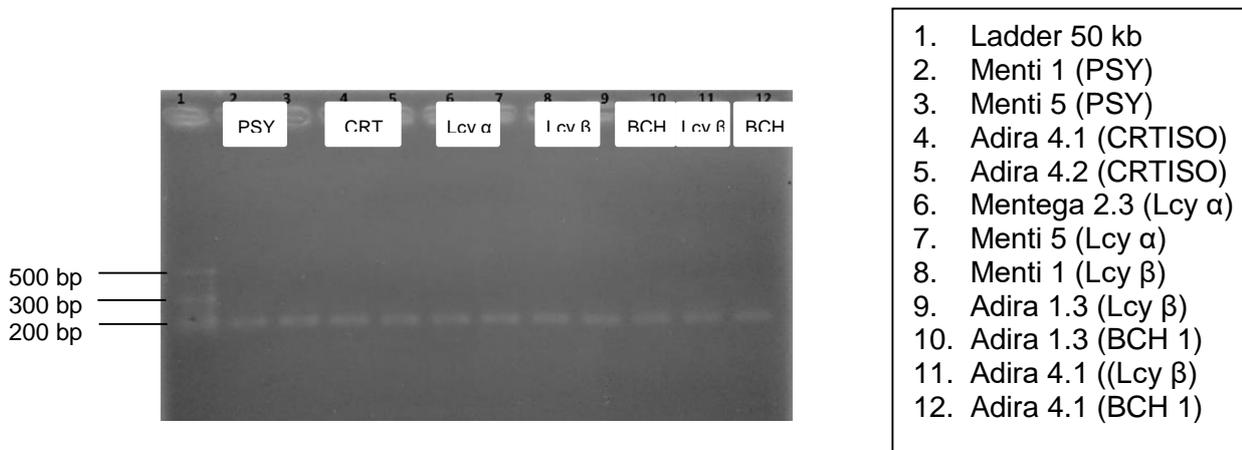
Terdapat faktor-faktor lain yang harus diperhatikan dalam spesifisitas primer seperti *repeats* yang merupakan pengulangan dinukleotida secara berurutan dan *runs* merupakan pengulangan nukleotida secara berurutan. Primer tidak diperbolehkan mengandung tiga atau lebih *repeats* dan *runs* (PBI, 2009). Hal ini dikarenakan adanya *repeats* dan *runs* akan meningkatkan kemungkinan *false priming*. Adanya *false priming* atau kesalahan

penempelan primer di luar suhu *annealing* akan mengakibatkan kesalahan pembentukan produk pada suhu tertentu sehingga hasil yang diinginkan tidak sesuai.

Setelah primer dipilih dari beberapa alternatif primer, primer di BLAST pada *Manihot esculenta database* melalui website Phytozome 12. Spesifisitas primer diuji dengan memasukkan sekuen primer (Tabel 1) pada program BLAST *Manihot esculenta database* Phytozome 12. Hasil BLAST dapat dilihat pada Tabel 3. Berdasarkan Tabel 3 dapat dilihat bahwa setiap pasang primer *forward* dan *reverse* memiliki *score* 37.4 dengan *E value* 0.0 dan persentase *Identity* 100%. Setiap sekuen primer yang didesain mengenali gen target yang akan dianalisis. Hasil yang diperoleh (Tabel 2) menunjukkan sekuen primer hanya berasal dari *Manihot esculenta* dan dapat dijadikan sebagai primer spesifik yang akan digunakan untuk .

Tabel 2. Hasil Identifikasi sekuen primer Gen Penyandi Beta-Karoten pada Ubi Kayu Menggunakan Program BLAST *Manihot esculenta Database* Phytozome 12

Primer Name	Primer	Accession Number	Score	E Value	Identity (100%)	Description	Cromosom	Primer Position
PSY	Forward	cassava4.1_008121m.g	37.4	0.0	100	Phytoene synthase	Kromosom 1 (24153420-24156720)	24156134-24156153
	Reverse							24156270-24156289
CRTISO	Forward	cassava4.1_003897m.g	37.4	0.0	100	Carotene isomerase	Kromosom 8 (3396806-3402102)	3400958-3400977
	Reverse							3401724-3401743
LCY A	Forward	cassava4.1_005406m.g	37.4	0.0	100	Lycopene α	Kromosom 16 (25581180-25586577)	25582005-25582024
	Reverse							25581364-25581383
LCY B	Forward	cassava4.1_004296m.g	37.4	0.0	100	Lycopene β	Kromosom 12 (7135712-7144162)	7142665-7142684
	Reverse							7143570-7143589
BCH 1	Forward	Manes.02G018300.1	37.4	0.0	100	Beta-carotene hydroxylase	Kromosom 2 (1492088-1493427)	1493108-1493127
	Reverse							1493383-1493402



Gambar 1. Hasil elektroforesis cDNA pada suhu *annealing* 60°C dengan menggunakan 5 macam primer (PSY, CRTISO, Lcy α , Lcy β dan BCH 1).

Keberhasilan desain primer dapat diuji secara *in vitro* melalui teknik PCR. Melalui teknik PCR, dapat diketahui kemampuan amplifikasi primer dan deteksi produk PCR dengan teknik elektroforesis gel agarosa 1%. Hasil dapat dilihat pada Gambar 1. Dari Gambar 1 dapat diketahui bahwa terdapat satu pita yang muncul pada setiap jalur gel agarose 1 % yang memiliki panjang berkisar 150-200 *bp*. Suhu yang diujik hanya 60 °C dikarenakan produk PCR telah terbentuk dengan baik. Spesifisitas primer juga dapat diketahui dengan mulculnya satu pita pada gel agarose. Hal ini menunjukkan primer yang diuji mengenali gen target.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil desain primer dengan *software* primer 3 plus dan hasil visualisasi produk PCR dengan gel agarose 1% didapatkan lima primer yang spesifik yaitu primer PSY, CRTISO, LCY α , LCY β , dan BCH yang dapat mengidentifikasi gen-gen penyandi beta-karoten seperti PSY, CRTISO, LCY α , LCY β , dan BCH pada ubi kayu. Primer yang didesain sesuai dengan kriteria panjang primer, GC *content* dan temperatur *melting* untuk gen penyandi beta-karoten pada ubi kayu.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga saya dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan penulisan artikel ini. Terima kasih kepada Ibu Dr. Wahyuni, S.Si, M.Biomed dan Ibu Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si, M.Biomed yang sudah membimbing dalam pelaksanaan penelitian serta memberikan ide

dan saran dalam penulisan artikel. Terima kasih kepada semua pihak yang telah ikut berpartisipasi dan memberikan bantuan baik secara moril maupun materil demi lancarnya penelitian dan penulisan artikel.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd-Elsalam, K.A. (2003). Bioinformatic Tools and Guideline for PCR Primer Design. *African Journal of Biotechnology*, Vol 2(5). Pp 91-95.
- Bartlett, J. M. S. dan Stirling, D. (2003). *Methods in Molecular Biology. Vol. 226 : PCR Protocols* 2nd Editions. Totowa, NJ : Human Press Inc. 81-604.
- Borah, P. (2011). Primer Designing for PCR. *Science Vision.*, vol. 11(3): 134-136.
- Campbell, N. A., dan J. B. Reece. (2008). *Biologi Edisi ke 8 Jilid 1*. (diterjemahkan dari : Biology Eighth Edition, penerjemah : D.T. Wulandari).Jakarta: Erlangga.
- Carvalho, L. J., Marco AV Agustini, James V Anderson, Eduardo A Vieira, Claudia RB de Souza, Songbi Chen, Barbara A Schaal and Joseane P Silva. (2016). Natural variation in expression of genes associated with carotenoid biosynthesis and accumulation in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) storage root *BMC Plant Biology*.
- Dieffenbach, C.W., T. M. Lowe dan G. S. Dveksler. (1993). General Concepts for PCR Primer Design. *Genome Res*, 3: S30-S37
- Dieffenbach, C.W., and G.S. Dveksler. (Eds). (1995). *PCR Primer: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hartati, S., H. Fitriani, Supatmi, dan E. Sudarmonowati. (2012). Karakter Umbi Dan Nutrisi Tujuh genotif Ubi Kayu (*Manihot esculenta*). *Agricola*, 2, 101-110.
- Histifarina, D., D. Musaddad, dan E. Murtiningsih. (2004). Teknik Pengeringan dalam Oven untuk Irisan Wortel Kering Bermutu. Balai Penelitian Tanaman Sayuran. *Jurnal Hortikultura*, 14(2), 107-112.
- Judelson, H. (2006). Guidelines For Designing Primers. *Primer Guidelines*, 10 (6): 1-5.
- McPherson, M. J., B. D. Hames, dan G. R. Taylor. (2001). *PCR 2 A Practical Approach*. Oxford University Press. New York.
- Muladno. (2010). *Teknologi Rekayasa Genetika Edisi Kedua*. Bogor: IPB Press.
- Premier Biosoft International (PBI). (2009). *Net Primer Manual*. (online).

- Sasmito, Dinda Eling K., Rahadian Kurniawan, Izzati Muhimmah. (2014). Karakteristik Primer pada *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review. *Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed) V*.
- Udvardi, M. K., Tomasz Czechowski and Wolf-Rudiger Scheible. (2008). Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *Plant Cell*, 20, 1735-1737
- Yusuf, Z.K. (2010). Polymerase Chain Reaction (PCR). *Saintek*. 5(6): 1-6.
- Yuwono, T. (2006). *Bioteknologi Pertanian*. Yogyakarta: universitas Gajah Mada Press.